

明 細 書

核酸の濃縮精製方法および装置

技術分野

- [0001] 本発明は、検体の前処理を行うデバイスに関するものである。より詳しくは、核酸検査において、菌体などより検査対象となる核酸を取出すための前処理デバイスに関するものである。

背景技術

- [0002] 近年、ヒトゲノムの解読が進み、さまざまな生命現象と遺伝子の関連が解明されてきている。そして、この成果により、医学・医療は病態から病因へ、治療から予防へと視野を広げている。ここにおいて、遺伝子検査技術は重要な基盤となっている。

遺伝子検査は、培養困難な病原微生物の同定検査、抗生物質加療中や感染初期の病原微生物の検出、移行抗体が疑われた際の抗原検出、病原微生物の感染源調査、親子鑑定などの個人識別、さらに白血病・固形腫瘍の遺伝子レベルの病型診断や遺伝病の確定診断など従来の臨床検査では困難であった検査を行うことができる。そして、結果を得るまでの時間が、菌の培養を用いる手法に比べて短く、培養に時間のかかる細菌の検出には威力を発揮する。さらにDNAは保存条件によっては安定しているため、凍結生検材料、骨など過去の検体からも検査を行うことができる。

また、近年増加傾向にある性感染症の検査において、検査機会の拡大を図るべく、遺伝子検査が注目されている。

- [0003] 従来核酸の精製濃縮方法としては、フェノール／クロロホルム／エタノールを用いた精製方法、核酸を吸着するカラム／フィルターを用いた精製方法、磁性シリカビーズを用いた精製方法等が知られている。
- [0004] さらに、平板状の電気泳動ゲルから核酸を回収する方法として、作成したゲルにおいて核酸を電気泳動し、ゲルにおいて目的とする核酸の位置に回収装置を移動し、更なる電気泳動により目的とする核酸を回収する方法が知られている（例えば、特許文献1参照）。

この他に、平板状の電気泳動ゲルにおいて、核酸を電気泳動して目的とする核酸

を分離し、目的とする核酸のバンド近傍に回収チップを挿入して核酸を回収する方法が知られている(例えば、特許文献2参照)。

しかし、従来核酸の精製濃縮方法において、フェノール/クロロホルム/エタノールを用いた精製方法は、劇薬を使用するため、高度の化学設備を必要とするものであり、利用する環境が限定される。そして、操作に手間がかかるとともに、高速遠心が必要となり、自動化が困難である。また、高い精製精度を得ることが困難である。

核酸を吸着するカラム/フィルターを用いた精製方法は、溶液を流しながら行うため、ごみ等の混入量の多いサンプルでは、カラム/フィルターが目詰まりを起こしやすく、精製効率が低くなる可能性がある。そして、遠心もしくは吸引操作を行う必要があるため、自動化が困難である。

さらに、磁性シリカビーズを用いた精製方法は、磁石によるビーズの回収を失敗した場合や、シリカビーズが磁性体より剥落した場合には、サンプルにシリカが混入する可能性がある。そして、高い回収率を得ることが困難である。

[0005] さらに、平板状の電気泳動ゲルから核酸を回収する従来の技術においては、平板状の電気泳動ゲルを必要とするとともに、この平板状の電気泳動ゲルにおいて一端電気泳動を行い、目的核酸の該当位置のゲルを処理する必要がある。

電気泳動に用いられるゲルは、衝撃に弱く、生成過程により、特性が大きく異なる場合がある。このため、一般に電気泳動を行った後に、紫外線により電気泳動ゲルにおける目的核酸の位置を認識した後に、目的核酸の含有量の多い部分を処理するものである。

[0006] このため、遺伝子検査等にこの手法を利用する場合には、一回の検査にかかる時間が長くなる。また、電気泳動に用いるゲルが大きくゲルのムラによる核酸のバンドにじみにより核酸の回収率が低下する可能性がある。さらに、ゲルが大きい場合には、電気泳動に必要となる電力が大きくなる。

特許文献1:実開平5-88296号公報

特許文献2:特開平8-327595号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 解決しようとする問題点は、核酸の精製濃縮方法において、複雑かつ高度な化学設備を必要とすることである。

課題を解決するための手段

[0008] 上記の課題を解決すべく、様々の試験が行われ、検体中に存在する夾雑物に界面活性剤を吸着させ、核酸と異なる挙動を示させることにより、夾雑物と核酸とを分離させることが見出されたものである。

そして、陽イオン界面活性剤と非イオン界面活性剤で核酸以外の夾雑物を帯電させ、電界中におくことで、夾雑物を含む検体より核酸を分離精製し、核酸の濃縮もしくは濃縮しやすい状態とするものである。

[0009] 図1は界面活性剤存在下における電気泳動による核酸濃縮構成を示す模式図である。

検体中には、核酸1とともに夾雑物2が含まれるものである。この検体中に、界面活性剤を混合する。界面活性剤としては非イオン界面活性剤3と陽イオン界面活性剤4とを用いるものである。

検体中に混合された界面活性剤は夾雑物2に吸着する。非イオン性界面活性剤による家電量の調整や、塩化ナトリウムなどの塩類やポリアニオン性物質（ヘパリン、デキストラン硫酸、DNA）の添加によっても核酸と陽イオン界面活性剤の吸着を調整することができる。

陽イオン界面活性剤4が吸着した夾雑物2は、正電荷に帯電することとなる。そして、界面活性剤の吸着した夾雑物2と、界面活性剤の吸着していない、もしくは吸着量の少ない核酸1とを電気泳動により分離することができるものである。これにより、検体から夾雑物2を容易に取り除くことができ、核酸1を濃縮できるものである。

[0010] 次に、核酸濃縮の手法について説明する。

この核酸濃縮の手法において、電気泳動を2回行うことにより、核酸の濃縮を確実に行うものである。第一の電気泳動においては検体中の余分なイオンを除き、第二の電気泳動においては検体中の核酸の濃縮を行うものである。

[0011] 核酸を含む検体に添加する非イオン界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレン-p-tert-オクチルフェニル エーテル(Triton系界面活性剤等)、ポリオキシエチ

レン ソルビタン アルキル エステル(Tween系界面活性剤等)、ポリオキシエチレンアルキル エーテル(Brij系界面活性剤等)等の非イオン性界面活性剤が使用でき、具体的には、例えば、TritonX-100、Tween-20、Brij35等があげられる。好ましくは1%のTritonX-100が望ましい。当該界面活性剤の添加により細胞膜、核膜が溶解されない場合には、非イオン界面活性剤を加えた後、96℃で10分間加熱処理を行う。

検体に陽イオン界面活性剤として、ゼフィラミン、セチルトリメチルアンモニウムクロライド、セチルピリニジウムメチルアンモニウムクロライド、デシルピリジニウムクロライド(DPC)があげられる。好ましくは0.2%DPCを100 μ L加える。

なお、検体には、非イオン界面活性剤と陽イオン界面活性剤を同時に加えた後に、加熱処理を行うことも可能である。

検体に界面活性剤を加えて前処理を行うため、核酸が大腸菌などの原核細胞内に存在する場合においても、細胞壁が界面活性剤により破壊されることから、大腸菌の培養液などを検体として用いることができ、検体前処理の操作を容易に行うことができるものである。

このように検体の前処理を行い、100Vの直流電圧を加え10分間電気泳動を行い、検体中の余分なイオンを除去する。

この後に、125～150Vの直流電圧を加え、120分間電気泳動を行い、正極側において核酸を採取するものである。

[0012] 検体の電気泳動を行う電気泳動槽の構成について説明する。

まず、第一の電気泳動について説明する。

図2は第一電気泳動の泳動槽構成を示す図である。

電気泳動槽5内にはサンプル槽6、正極側と負極側とを分ける隔壁9が設けられている。サンプル槽6は隔壁9に貫通しており、一端が正極側に、他端が負極側に突出した構成となっている。サンプル槽6の両端は開口しており、両端の開口部はそれぞれゲル8・8により閉じられている。これにより、サンプル槽6内に電位差を発生させて核酸および界面活性剤が吸着した夾雑物の電気泳動を行うものである。

[0013] 検体に非イオン界面活性剤と陽イオン界面活性剤を加え、加熱処理を行った後に

、検体をサンプル槽6に注入する。

そして、電極間に100Vの電圧を加えて、10分間の電気泳動を行うものである。

これにより、検体中に含まれる余分なイオンを除くものである。

検体中に含まれる余分なイオンを除いた後に、第二の電気泳動により核酸の濃縮を行うものである。

[0014] 第二電気泳動について説明する。

第二の電気泳動においては、第一の電気泳動で検体を注入したサンプル槽に、核酸の回収槽を接続していたものを電気泳動槽内に配置して電気泳動を行うものである。

図3は第二電気泳動の泳動槽構成を示す図である。

電気泳動槽5内にはサンプル槽6、回収槽7、正極側と負極側とを分ける隔壁9が設けられている。サンプル槽6は隔壁9に挿入され、負極側に突出した構成となっている。回収槽7は隔壁9に挿入され、正極側に突出した構成となっている。サンプル槽6と回収槽7とは隔壁9配設部において接続されており、ゲル8を介して接続されている。

サンプル槽6の両端は開口しており、両端の開口部はそれぞれゲル8・8により閉ざされている。そして、回収槽7の両端は開口しており、負極側はゲル8により閉じられており、正極側は限外ろ過膜11により閉じられている。

このように構成された電気泳動槽において、電極間に120Vの電圧を加え、120分間の電気泳動を行うものである。

[0015] このように、電気泳動槽において第二の電気泳動を行うことにより、余分なイオンを除いた検体を電気泳動することができ、回収槽7において核酸を効率的に回収できるものである。また、回収槽7の正極側には限外ろ過膜11を設けており、核酸は回収槽7より排出されることなく、回収槽7内にとどまる。このため、核酸の回収効率を向上することができるものである。

なお、検体の状態によっては、第一の電気泳動を行うことなく、第二の電気泳動を行うことも可能である。回収槽7に接続したサンプル槽6に前処理を行った検体を注入して電気泳動することにより、容易に核酸の濃縮を行うことができるものである。検

体中に存在する余分なイオンは限外ろ過膜を透過できるので、核酸の回収に影響をあたえない。

[0016] すなわち、本発明は第1に、電気泳動を用いた核酸の濃縮精製方法であって、核酸を含む試料中の夾雑物に対して、荷電量の調節を行った後に、試料を電界中におき、核酸の濃縮精製を行う。

[0017] 第2に、電気泳動による核酸の濃縮精製方法であって、核酸を含む試料に陽イオン界面活性剤を加えて、試料中夾雑物への荷電量を調節し、該試料を電界中におき、電気泳動することにより、核酸の濃縮精製を行う。

[0018] 第3に、電気泳動による核酸の濃縮精製方法であって、核酸を含む試料中に陽イオン界面活性剤および非イオン界面活性剤を加えて、試料中夾雑物への荷電量を調節し、該試料を電界中におき、電気泳動することにより、核酸の濃縮精製を行う。

[0019] 第4に、核酸以外への荷電量調節を、陽イオン界面活性剤の吸着により行うとともに、陽イオン界面活性剤の吸着量を非イオン界面活性剤の添加量により調節する。

[0020] 第5に、試料に非イオン界面活性剤および陽イオン界面活性剤を添加し、該試料を電気泳動し、陽極側において核酸の濃縮精製を行う装置を構成する。

[0021] 第6に、電気泳動を行う核酸の濃縮精製装置であって、側面を絶縁体により構成した容器内を、拡散を抑制する導電性の分離体により仕切り、該容器内に試料投入室および核酸回収室を構成し、該容器の端部がそれぞれバッファ槽を介して、電極に接続している装置を構成する。

発明の効果

[0022] 本発明は、第1に、電気泳動を用いた核酸の濃縮精製方法であって、核酸を含む試料中の夾雑物に対して、荷電量の調節を行った後に、試料を電界中におき、核酸の濃縮精製を行う方法をとるので、電気泳動における核酸と夾雑物の挙動に相違をあたえ、核酸を効率的に分離できる。夾雑物と核酸との挙動における差異を荷電により調節可能であり、挙動の制御を容易に行える。

遠心分離装置などを利用する必要がなく、核酸濃縮を行う機構をコンパクトに構成することができる。

[0023] 第2に、電気泳動による核酸の濃縮精製方法であって、核酸を含む試料に陽イオ

ン界面活性剤を加えて、試料中夾雑物への荷電量を調節し、該試料を電界中におき、電気泳動することにより、核酸の濃縮精製を行うことができ、陽イオン界面活性剤を用いるので、操作容易であり、作業の安全を容易に確保できる。

そして、夾雑物への吸着量を増大させることにより、電気泳動における核酸と夾雑物との挙動差を大きくすることができ、核酸を効率的に分離できる。さらに、夾雑物が核酸とは反対方向に泳動されるので、夾雑物による精製の阻害を防止でき、核酸の精製を容易に行うことができる。

[0024] 第3に、電気泳動による核酸の濃縮精製方法であって、核酸を含む試料中に陽イオン界面活性剤および非イオン界面活性剤を加えて、試料中夾雑物への荷電量を調節し、該試料を電界中におき、電気泳動することにより、核酸の濃縮精製を行うので、陽イオン界面活性剤と非イオン界面活性剤との割合により陽イオン界面活性剤の吸着量を調節可能であり、電気泳動における夾雑物の挙動を容易に調節できるものである。

また、核酸に非イオン界面活性剤を吸着させることにより、核酸への陽イオン界面活性剤の吸着を阻害することも可能である。

[0025] 第4に、核酸以外への荷電量調節を、陽イオン界面活性剤の吸着により行うとともに、陽イオン界面活性剤の吸着量を非イオン界面活性剤の添加量により調節するので、容易な操作により、夾雑物への陽イオン界面活性剤と非イオン界面活性剤の吸着割合を操作することができる。さらに、夾雑物帯電量の調節を容易な操作により行うことができる。また、核酸に非イオン界面活性剤を吸着させることにより、核酸への陽イオン界面活性剤の吸着を阻害することも可能である。

[0026] 第5に、試料に非イオン界面活性剤および陽イオン界面活性剤を添加し、該試料を電気泳動し、陽極側において核酸の濃縮精製を行う装置を構成するので、簡便な構成により、試料中の核酸を精製できるとともに、核酸の挙動を制御可能であるため、安全性を維持しながら、濃縮精製装置をコンパクトに構成できる。

[0027] 第6に、電気泳動を行う核酸の濃縮精製装置であって、側面を絶縁体により構成した容器内を、拡散を抑制する導電性の分離体により仕切り、該容器内に試料投入室および核酸回収室を構成し、該容器の端部がそれぞれバッファ槽を介して、電極に

接続している装置を構成するので、簡便な構成により、濃縮精製装置を構成可能であり、製作にかかるコストを低減するとともに、制御が容易かつ安全性の高い装置を構成することが可能である。

図面の簡単な説明

[0028] [図1]界面活性剤存在下における電気泳動による核酸濃縮構成を示す模式図。

[図2]第一電気泳動の泳動槽構成を示す図。

[図3]第二電気泳動の泳動槽構成を示す図。

[図4]第一電気泳動槽の構成を示す図。

[図5]第二電気泳動槽の構成を示す図。

[図6]サンプリングユニットの構成を示す斜視図。

[図7]サンプリングユニットの平面図。

[図8]サンプリングユニットの側面図。

[図9]サンプリングユニットの側面断面図。

[図10]接続部の斜視図。

[図11]接続部の側面断面図。

[図12]ろ過部の側面断面図。

[図13]分離ユニットの組立て構成を示す図。

[図14]回収された液のUVスペクトル。

[図15]電気泳動装置の全体構成を示す図。

[図16]電気泳動ユニットの斜視図。

[図17]電気泳動ユニットの側面断面図。

[図18]電気泳動ユニットによる精製過程の前期を示す模式図。

[図19]同じく精製過程の後期を示す模式図。

[図20]電気泳動ユニットの組み付け構成を示す側面断面図。

[図21]同じく斜視図。

[図22]第1ブロックの構成を示す図。

[図23]第2ブロックの構成を示す図。

[図24]パッキンの正面図。

[図25]淋菌ゲノムの精製における比較結果を示す図。

[図26]DNAの濃縮結果を示すサンプルを電気泳動したゲルを示す図。

符号の説明

- [0029]
- 1 核酸
 - 2 夾雑物
 - 3 非イオン界面活性剤
 - 4 陽イオン界面活性剤
 - 5 電気泳動槽
 - 6 サンプル槽
 - 9 隔壁

発明を実施するための最良の形態

- [0030] 危険な薬品を使うことなく、精製率の高い核酸濃縮装置を構成するという目的を、界面活性剤と電気泳動を用いた手法により実現した。

実施例 1

- [0031] 次に、本発明の実施例について説明する。

まず、電気泳動に用いる電気泳動槽の構成について説明する。

図4は第一電気泳動槽の構成を示す図である。

電気泳動槽21は隔壁24・25により、負極側槽22と正極側槽23とに分けられている。隔壁24・25は電気泳動槽21の中央部に配設されており、隔壁24・25にサンプルユニット26が装着されている。サンプルユニット26は一端を負極側槽22に、他端を正極側槽23に突出した構成となっている。サンプルユニット26の負極側にはゲルが詰められており、側面にサンプル注入用の注入孔が開けられている。注入孔は電気泳動時には栓により閉じられるものである。

そして、負極側槽22に負極が挿入され、正極側槽23に正極が挿入され、電気泳動槽21に電圧がかけられるものである。

- [0032] 次に、電気泳動槽の他の構成例について説明する。

図5は第二電気泳動槽の構成を示す図である。

第二電気泳動において、電気泳動槽21は隔壁24・25により、負極側槽22と正極

側槽23とに分けられている。隔壁24・25は電気泳動槽21の中央部に配設されており、隔壁24・25に分離ユニット32が装着されている。分離ユニット32は一端を負極側槽22に、他端を正極側槽23に突出した構成となっている。そして、負極側槽22に負極が挿入され、正極側槽23に正極が挿入され、電気泳動槽21に電圧がかけられるものである。

分離ユニット32は、3つの部材を接続して構成するものであり、サンプリングユニット26、接続部33、ろ過部34とにより構成される。サンプリングユニット26と接続部33との間、および接続部33とろ過部34との間にはOリングが装着され接続を確保するとともに、緩衝液の流出を防止しているものである。

なお、サンプリングユニット26の負極側にはゲルが詰められており、接続部33の正極側にもゲルが詰められている。そして、ろ過部34には限外ろ過膜が装着されている。

[0033] このような電気泳動槽を用いて、核酸の濃縮を行うものである。

まず、第一電気泳動において、前処理したサンプルを注入孔より入れ栓をする。そして、電気泳動槽21にサンプルユニット26を上面が少し液から出るように設置する。この後、100Vの直流電圧をかけ、20分間電気泳動を行うものである。これによりサンプル中の余分なイオンを取り除くものである。なお、緩衝液は1xTAE溶液、40mM Tris、40mM 氷酢酸、1mM EDTAにより調製し、pH8.0とした。

[0034] そして、第一電気泳動槽21において余分なイオンを取り除いた後に、サンプルユニット26に接続部33およびろ過部34を接続するものである。各接続個所にはOリングを装着し、液漏れを防ぐものである。

接続部33内には、100%エタノールと1xTAEを6:4で混合した液を入れ、サンプリングユニット26内にはTE-1(10mM Tris-HCl、0.1mM EDTA、pH8.0)を入れておくものである。ろ過部34にはTE-1を入れておく。

[0035] 次に、サンプリングユニット26、接続部33、ろ過部34の構成について説明する。

まず、サンプリングユニット26の構成について説明する。

図6はサンプリングユニットの構成を示す斜視図であり、図7はサンプリングユニットの平面図であり、図8はサンプリングユニットの側面図であり、図9はサンプリングユニ

ットの側面断面図である。

サンプリングユニット26は、容器にゲルを保持させて構成するものであり、ミリポア社製のマイクロコン(登録商標)YM-3 マイクロコン 遠心式フィルタユニットを加工して利用するものであり、内部の限外ろ過膜をはずし、内部に直径5mmの孔を開けたものである。なお、同様の効果を得られるものであれば、これに限らず用いることが出来るものである。

サンプリングユニット26は筒体41と台座43とにより構成されている。筒体41は台座43に接続しており、サンプルを注入するための注入孔42が設けられている。台座43は段付き円柱状に構成されており、台座43には上下面に連通する孔44が構成されている。

筒体41内にはゲル48が配設されている。ゲル48の厚みは数mm程度であり、筒体41の開口部をふさぐ構成となっている。これにより、注入孔42より供給された検体がゲル48の内側に供給されるものである。

[0036] 接続部33の構成について説明する。

図10は接続部の斜視図であり、図11は接続部の側面断面図である。

接続部33もサンプリングユニット26と同様に、ミリポア社製の遠心式フィルタユニットを加工して利用するものであり、内部の限外ろ過膜をはずし、内部に直径5mmの孔を開けたものである。

接続部33は筒体41と台座43とにより構成されている。筒体41は台座43に接続している。台座43は段付き円柱状に構成されており、台座43には上下面に連通する孔44が構成されている。

筒体41内には、厚み数mm程度ゲル48を配設している。ゲル48は、筒体41内において、台座43の上面に位置しており、サンプリングユニット26との間の液体の流動を防止するものである。

[0037] ろ過部34について説明する。

図12はろ過部の側面断面図である。

ろ過部35もミリポア社製の遠心式フィルタユニットを加工して利用するものである。

ろ過部35は筒体41と台座43とにより構成されている。筒体41は台座43に接続し

ており、筒体41の長さはサンプリングユニット26や接続部33よりも短く構成されており、約5mm短く構成されているものである。台座43は段付き円柱状に構成されており、台座43には上下面に連通する孔44が構成されている。

そして、筒体41内において、台座43の上面に限外ろ過膜49が配設されている。これにより核酸の流出を防ぎ、核酸の濃縮を行うことが可能となる。

[0038] 次に、核酸の濃縮操作例について説明する。

検体として、大腸菌培養液を用いて、上記の第一電気泳動および第二電気泳動により核酸の濃縮を行い、回収された核酸濃度を吸光度測定により調べた。

検体は、大腸菌 (*Escherichia coli* DH5 α) 培養液100 μ Lを用いた。

検体に、1% Triton (登録商標) X-100溶液100 μ Lを加え、96°Cで10分間加熱処理した。

この後に0.2%DPCを100 μ L加え、電気泳動用の試料を調製した。

[0039] 電気泳動用のバッファとしては0.5xTAEを使用した。

アガロースの溶解には1xTAEを使用した。

なお、1xTAE溶液は、40mM Tris、40mM 氷酢酸、1mM EDTAにより調製し、pH8.0とした。

接続部33を筒体41の開口側を上方にして静置し、筒体41の開口側より、1%アガロースゲル (SeaKem Gold agarose: TaKaRa) をゲルの厚さが3〜7mm程度になるように流し込み、ゲルを固めた。

サンプリングユニット26も接続部33と同様に、筒体41の開口側を上方にして静置し、筒体41の開口側より、1%アガロースゲル (SeaKem Gold agarose: TaKaRaから購入) をゲルの厚さが数mm程度になるようにした。そして、ゲルが固まった後に、サンプリングユニット26をひっくり返し、筒体41の開口側に固まったゲルを流し込んだ。

[0040] 電気泳動槽はHU-6 (エアブラウン社製) を用い、電源はMPSU-200 (エアブラウン社製) を用いた。

サンプリングユニット26の注入孔42より、調製した電気泳動用試料を入れて栓をした。

電気泳動槽をパテにより正極側と負極側とに分離し正極側と負極側に0.5xTAEを入れた。

そして、パテにサンプリングユニット26の上面が少しバッファ液から出るように設置した。

この後に、直流電圧100Vをかけ、20分間第一の電気泳動を行った。

[0041] 次に、第一の電気泳動を行った後のサンプリングユニット26に接続部33と、ろ過部34とを接続して、分離ユニットを構成し、第二の電気泳動を行うものである。

第二電気泳動の操作例を説明する。

100%エタノールと1xTAEとを6対4で混合した溶液を接続部33内に入れた。

TE-1 (10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH8.0) 溶液をろ過部34内に入れた。

次に、サンプリングユニット26に接続部33と、ろ過部34とを接続して、分離ユニットを組み立てた。

[0042] 図13は分離ユニットの組立て構成を示す図である。

分離ユニットは、サンプリングユニット26、接続部33、ろ過部34を同一方向に向けて組み立てるものであり、接続部33とろ過部34との間、および接続部33とろ過部34との間にOリング51をそれぞれ装着して、分離ユニットよりの液漏れを防ぐものである。

[0043] 電気泳動槽をパテにより正極側と負極側とに分離し正極側と負極側に0.5xTAEを入れた。

組み立てた分離ユニットのサンプリングユニット26側端を負極側に、ろ過部34を正極側にしてパテに配置した。

この後に、直流電圧200Vをかけ、240分間、第二の電気泳動を行った。

[0044] 次に、ろ過部34において核酸溶液を回収して、吸光度の測定を行い、UVスペクトルより回収された核酸濃度を算出した。

図14は回収された液のUVスペクトルである。

算出された核酸濃度は、32.3ng (6.7×10^6 コピー / μ L) であった。

核酸濃度の算出は、260nmにおける吸光度 (A_{260}) に、核酸の性状固有の係数

をかけ、さらに、セルの光路長 (mm) をかけて、10で割ったものである。

[0045] また、回収された核酸の純度を、UVスペクトルより算出した。

算出された核酸の純度は、1.91であった。

純度の算出は、260nmにおける吸光度(A260)を、280nmにおける吸光度(A280)で割ることにより、行うものである。サンプルが純度100%のDNAの場合、この値は約1.8となる。また、純度100%のRNAの場合には2.0となる。A280の値は、被測定物に混入しているタンパク質やフェノールの量を反映し、吸光度比が1.5を大きく下回るような場合は、タンパク質などの低分子物質の混入が考えられるものである。

実施例 2

[0046] 次に、第2の実施例における電気泳動装置について説明する。

図15は電気泳動装置の全体構成を示す図である。

電気泳動装置50は、電気泳動槽50b内に配置する電気泳動ユニット51により検体中に含まれる核酸の濃縮を行うものである。電気泳動槽50bは、バッファ槽55・58および冷却水槽57を有し、バッファ槽55・56には電気泳動のためのバッファ溶液が満たされ、冷却水槽57には電気泳動ユニット51を冷却するために、氷水などの冷却水が満たされる。バッファ槽55には正極53が配設されており、バッファ槽56には負極54が配設されている。電気泳動ユニット51の端部は、それぞれバッファ槽55・56内に露出しており、この電気泳動ユニット51内に検体を導入して、正極53と負極54との間に電圧をかけることにより、検体中の核酸の濃縮を行う。

バッファ槽55・56と冷却水槽57とは隔壁52により区切られており、隔壁52および電気泳動槽50bは絶縁性のあるものを用い、隔壁52としてはシリコーン系充填材やエポキシ樹脂系のパテを用いることができる。隔壁52により電気泳動ユニット51の側部は冷却水に接して、冷却されることとなる。これにより、電気泳動時の発熱を解消して、安定した温度環境で検体の精製を行うことができる。

[0047] 次に、電気泳動ユニット51について説明する。

図16は電気泳動ユニットの斜視図であり、図17は電気泳動ユニットの側面断面図であり、図18は電気泳動ユニットによる精製過程の前期を示す模式図であり、図19は同じく精製過程の後期を示す模式図である。

電気泳動ユニット51は主にアクリル樹脂などの絶縁素材により構成されるものであり、複数の部材をボルトなどにより固定して、1つの電気泳動ユニット51として構成される。電気泳動ユニット51は、内部に延出方向に沿った円柱上の空間51bが設けられており、この空間51bの延出方向と直交するように孔が2つ設けられている。1つは空間51b内に検体を導入するための導入孔67であり、もう1つは空間51bより濃縮した検体を採取するための採取孔66である。導入孔67および採取孔66はそれぞれ空間51bに連通している。

電気泳動ユニット51の内部には、回収槽71およびサンプル槽72が設けられており、導入孔67がサンプル槽72に採取孔66が回収槽71にそれぞれ接続している。サンプル槽72と回収槽71との間には、ゲル壁64が設けられており、サンプル槽72の負極側にもゲル壁64が設けられている。そして、回収槽71の正極側には限外ろ過膜65が配設されている。すなわち、サンプル槽72は2つのゲル壁64・64間に構成されており、回収槽71はゲル壁64と限外ろ過膜65との間に構成されている。

[0048] 次に、電気泳動ユニット51による精製過程について説明する。

検体の精製を行う場合には、電気泳動ユニット51内の空間51bは電気泳動用のバッファで満たされるものであり、サンプル槽72および回収槽71もバッファで満たされる。図18(a)に示すごとく、サンプル槽72に検体を導入した後に電気泳動ユニット51の両端に電圧を加える。なお、検体には精製を目的とする核酸と夾雑物、目的とする核酸よりも小さな核酸が含まれる。

電気泳動ユニット51に電圧をかけると、図18(b)に示すごとく、核酸1および余分な電解物2bが正極側に移動し、夾雑物2が負極側に移動する。そして、一定時間電圧をかけることにより、図19(c)に示すごとく、核酸1および余分な電解物2bがゲル壁64を通り回収槽71に到達する。さらに、継続して電圧をかけると、図19(d)に示すごとく、分子量の小さい余分な電解物2bは限外ろ過膜65を通り、回収槽71より排出される。そして、目的物である核酸1が回収槽71内にとどまることとなる。

このように、電気泳動ユニット51において、電気泳動および限外ろ過膜を用いることにより、検体中より目的の核酸1の分離を容易に行うことができる。

[0049] 次に、電気泳動ユニット51の各部の構成について説明する。

図20は電気泳動ユニットの組み付け構成を示す側面断面図であり、図21は同じく斜視図である。図22は第1ブロックの構成を示す図であり、図23は第2ブロックの構成を示す図であり、図24はパッキンの正面図である。

電気泳動ユニット51は、第1ブロック61、第2ブロック62、第3ブロック63とパッキン73および限外ろ過膜65とを組み合わせることにより構成される。第1ブロック61、第2ブロック62、第3ブロック63には、電気泳動ユニット51の空間51bを構成するための前後面に連通する孔が中央に設けられており、各ブロックをボルト止めするための前後面に連通する孔が四隅に設けられている。

第1ブロック61は電気泳動ユニット51の端部を構成するものであり、第2ブロック62はサンプル槽72および回収槽71を構成するものであり、第3ブロック63はゲル壁64を保持するものである。各ブロック間にはパッキン73が配設されてブロック間における冷却水の電気泳動ユニット51内への流入を防止する。電気泳動ユニット51の一端側に置いては、パッキン73・73により限外ろ過膜65が挟持される。

[0050] 第1ブロック61の中央部には、図22に示すごとく、孔61bが設けられており、これが電気泳動ユニット51の空間51bの一部を構成する。そして、第1ブロック61の四隅にはボルトを挿入するための孔61cが設けられている。

第2ブロック62の中央部には、図23に示すごとく、孔62bが設けられており、これが電気泳動ユニット51の空間51bの一部を構成する。第2ブロック62の四隅にもボルトを挿入するための孔62cが設けられている。そして、第2ブロック62には孔62bに連通する上下方向に設けた孔62dが設けられている。この孔62dが電気泳動ユニット51の導入孔67および採取孔66となる。

なお、第3ブロック63の形状は、第1ブロック61の前後方向の厚みを小さくしたものであり、中央に設けた孔にゲル壁64を保持するものである。

パッキン73は、正面視十字形のシートにより構成されている。中央部には孔73bが設けられており、本実施例においては厚さ0.5mmのシリコンシートにより構成されるものである。パッキン73は図24に示すごとく、四隅を切り欠いた構成となっており、ブロックを締結するためのボルトと接触しない形状となっている。なお、孔73bの径は第1ブロック61の孔61bや、第2ブロック62の孔62bの径と一致するものである。

限外ろ過膜65としては、孔73bより大きいものを用い、パッキン73・73により挟持可能とする構成となっている。

[0051] 次に、本実施例における電気泳動装置を用いた核酸の濃縮精製分離の試験について説明する。

[比較試験1]

比較試験1は、培養淋菌添加尿からの淋菌ゲノムの精製において、本実施例における電気泳動装置を用いたものと、磁性シリカビーズ法を用いたものとを比較したものである。

まず、本実施例における電気泳動装置を用いた操作について説明する。

チョコレート培地EX(日水製薬株式会社)で淋菌(*Nisseria gonorrhoeae*)を37℃で2日間培養した。

得られたコロニーを生理食塩水に懸濁し、吸光度がOD530=0.18となるように調整した後に、生理食塩水で100倍に希釈し、菌体希釈液を得た。

そして、健常人混合尿60μLに菌体希釈液1.2μLを添加した。これに、表1に示す組成の溶解バッファAを60μL加えて混合した。

混合液を96℃で10分間加熱した。混合液より100μLを採りサンプルとして、本実施例の電気泳動装置に導入し、電圧150Vで60分間の電気泳動を行った。

回収サンプル100μLのうち5μLについてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)処理を行い、蛍光強度を測定した。

PCR処理の処方表は表2に示すものであった。

なお、第1ブロック61のサイズは幅20mm、高さ20mm、厚み5mm、孔61bの直径は5mmであり、第2ブロック62も同様であり孔62dの直径は2mmであった。第3ブロック63のサイズ、幅と高さにおいて第1ブロック61と同様であり厚みは2.5mmであり、ゲル壁はアガロースゲルを用い、アガロースはSeaKem Gold agarose(TaKaRa)を用い、溶解液は10mM Tris-HCl(pH8.0)を用いた。限外ろ過膜としては、YM-100(ミリポア)を用いた。また、パッキン73の厚みは0.5mmであった。

[0052] 次に、磁性シリカビーズ法を用いた操作について説明する。

磁性シリカビーズとしてはMagExtractor(東洋紡績株式会社)を用いた。

混合液の96℃で10分間加熱までは、前記の電気泳動装置を用いた操作と同様に行った。混合液より100 μ Lを採りサンプルとして、MagExtractorのプロトコール通りに処理した。得られた回収サンプル100 μ Lのうち5 μ LについてPCR処理を行い、蛍光強度を測定した。

なお、PCR処理の熱サイクルとしては、表3に示すごとく、50℃で2分間保持したのちに、95℃で2分間保持した後に、95℃で10秒間保持と56℃で60秒間保持とを50サイクルまで行った。

[0053] [表1]

溶解バッファ A 組成

2 % (重量)	T r i t o n X - 1 0 0
0. 1 %	セチルトリメチルアンモニウム クロライド (C T A C)
1 0 mM	T r i s - H C l (p H 8. 0)
1 0 mM	E D T A (p H 8. 0)
3 0 0 mM	N a C l
1 6. 6 コピー/ μ L	ヒトゲノム

[0054] [表2]

P C R 処 方

1 反 応 あ た り の 処 方

H ₂ O	15.15	μL	
10X Gene Taq Buffer	2.5	μL	
10mM AUGC	0.5	μL	
100mM MgCl ₂	0.375	μL	
5 μM F-D-NG-R1-32	1	μL	
100 μM NG-F3405-20	0.125	μL	
100 μM NG 3526-20R	0.125	μL	
2U/μL UNG	0.1	μL	
5U/μL Gene Taq NT	0.125	μL	
20 μL +			回収サンプル 5 μL

[0055] [表3]

熱サイクル

5 0 °C	2 min	
9 5 °C	2 min	
9 5 °C	1 0 Sec	} 5 0 サイクル
5 6 °C	6 0 Sec	

[0056] 図25は淋菌ゲノムの精製における比較結果を示す図である。図25において太線は本実施例を用いたものであり、細線は磁性シリカビーズ法を用いたものである。なお、点線は標準である。

結果、本実施例を用いたものにおいて、磁性シリカビーズ法を用いたものより早く検出することができた。これは磁性シリカビーズ法よりも本発明の方が核酸の精製、分離の効率が高いことを示すものである。

[0057] [濃縮試験]

次に、本実施例における電気泳動装置を用いたDNAの濃縮操作について説明する。

本実施例における電気泳動装置において、サンプル槽の容積を200 μ Lとし、回収槽の容積を50 μ Lとしたものを用いた。

2. 7ng/ μ Lの λ /HindIII DNAを100 μ Lとし、100 μ Lの溶解液バッファAと混合して、サンプルを調整した。サンプルを電気泳動装置のサンプル槽に導入し、電圧100Vで30分間にわたり電気泳動を行い、濃縮した。

この後、濃縮前のサンプルおよび濃縮後の回収サンプルについてそれぞれ、2 μ L、4 μ L、6 μ L、8 μ Lを採り、ゲル電気泳動を行った。また、濃縮後の回収サンプルについてはサンプル量を10 μ Lとした電気泳動も行った。

図26はDNAの濃縮結果を示すサンプルを電気泳動したゲルを示す図である。

図26において、Aは濃縮前のサンプルであり、Bは濃縮後に回収されたサンプルである。図26に示すごとく、各サンプル量に対して、濃縮前のサンプルよりも濃縮後に回収されたサンプルにおいて、よりはっきりとしたバンドを得た。

図26において、回収サンプル2 μ Lのバンドの状態は、濃縮前の6 μ Lのバンド状態に相当するとおもわれる。

このことより、本実施例による電気泳動装置を用いてDNAの濃縮を行うことができた。

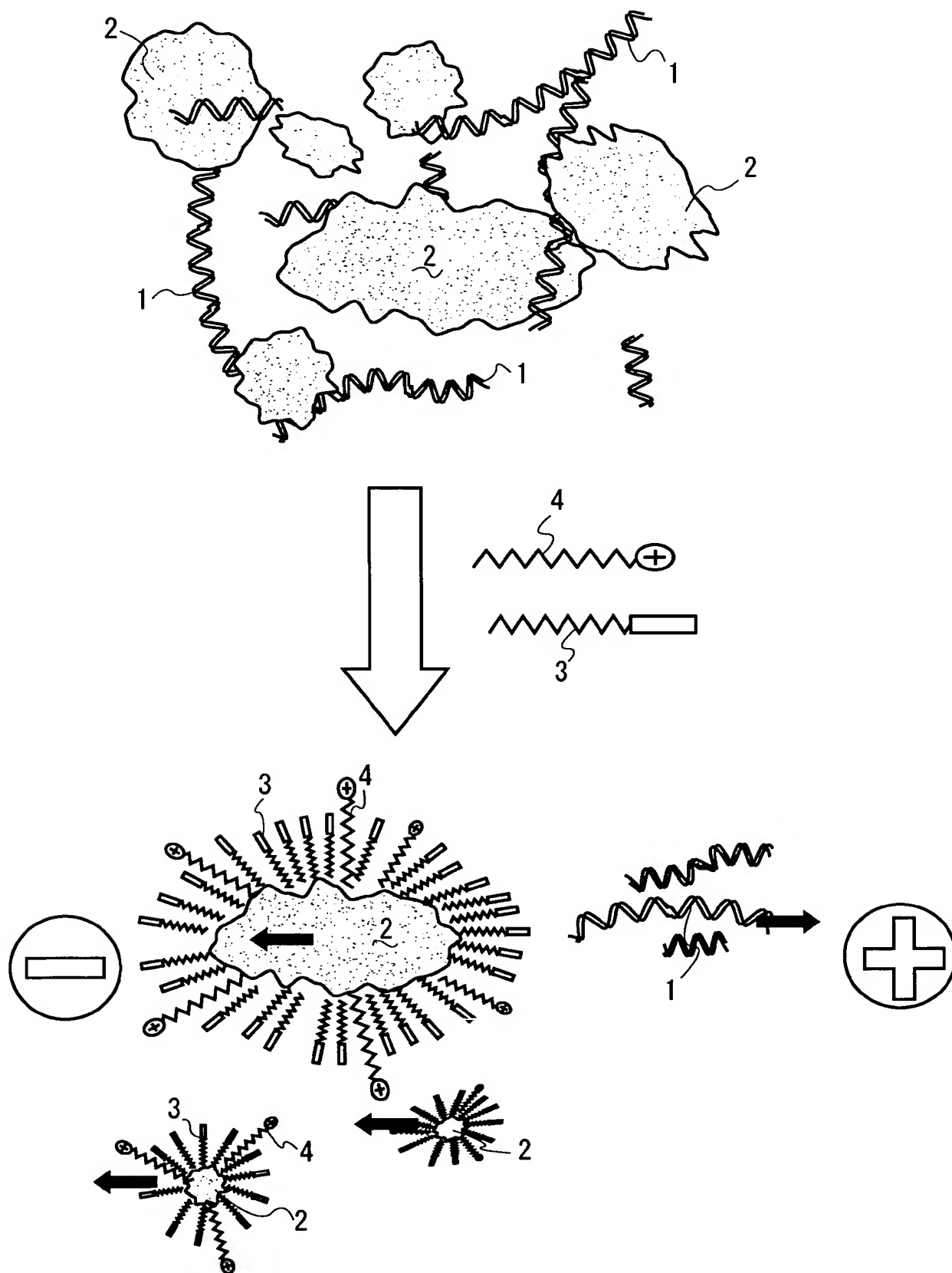
産業上の利用可能性

[0058] 本発明は、操作が簡便であるとともに、装置構成が簡易であるので、自動で核酸の濃縮および検査を行う検査装置などの用途にも適用できる。

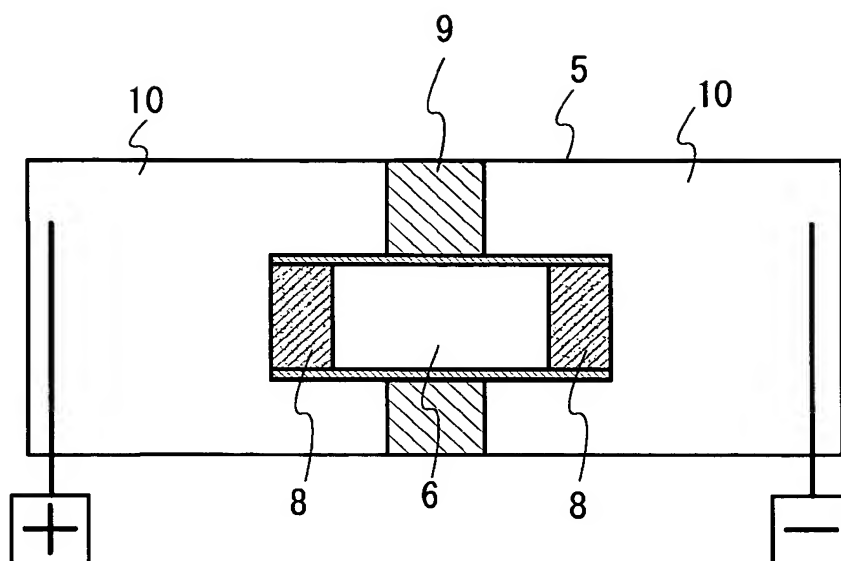
請求の範囲

- [1] 電気泳動を用いた核酸の濃縮精製方法であって、
核酸を含む試料中の夾雑物に対して、
荷電量の調節を行った後に、試料を電界中におき、
核酸の濃縮精製を行うことを特徴とする核酸の濃縮精製方法。
- [2] 電気泳動による核酸の濃縮精製方法であって、
核酸を含む試料に陽イオン界面活性剤加えて、
試料中夾雑物への荷電量を調節し、該試料を電界中におき、
電気泳動することにより、
核酸の濃縮精製を行うことを特徴とする核酸の濃縮精製方法。
- [3] 電気泳動による核酸の濃縮精製方法であって、
核酸を含む試料中に陽イオン界面活性剤および非イオン界面活性剤を加えて、
試料中夾雑物への荷電量を調節し、該試料を電界中におき、
電気泳動することにより、
核酸の濃縮精製を行うことを特徴とする核酸の濃縮精製方法。
- [4] 核酸以外への荷電量調節を、陽イオン界面活性剤の吸着により行うとともに、陽イオン界面活性剤の吸着量を非イオン界面活性剤の添加量により調節することを特徴とする請求項3に記載の核酸の濃縮精製方法。
- [5] 試料に非イオン界面活性剤および陽イオン界面活性剤を添加し、
該試料を電気泳動し、
陽極側において核酸の濃縮精製を行うことを特徴とする核酸の濃縮精製装置。
- [6] 電気泳動を行う核酸の濃縮精製装置であって、
側面を絶縁体により構成した容器内を、
拡散を抑制する導電性の分離体により仕切り、
該容器内に試料投入室および核酸回収室を構成し、
該容器の端部がそれぞれバッファ槽を介して、
電極に接続していることを特徴とする核酸の濃縮精製装置。

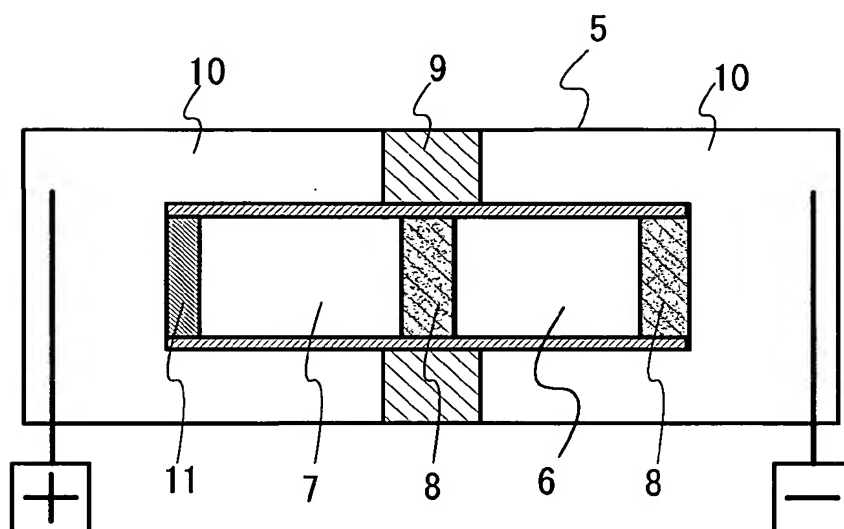
[図1]



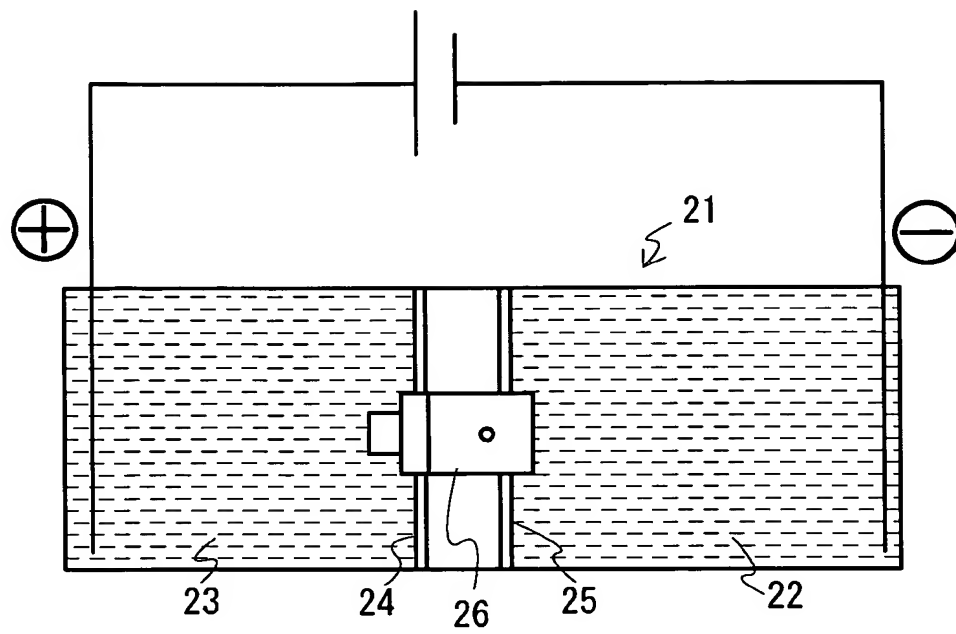
[図2]



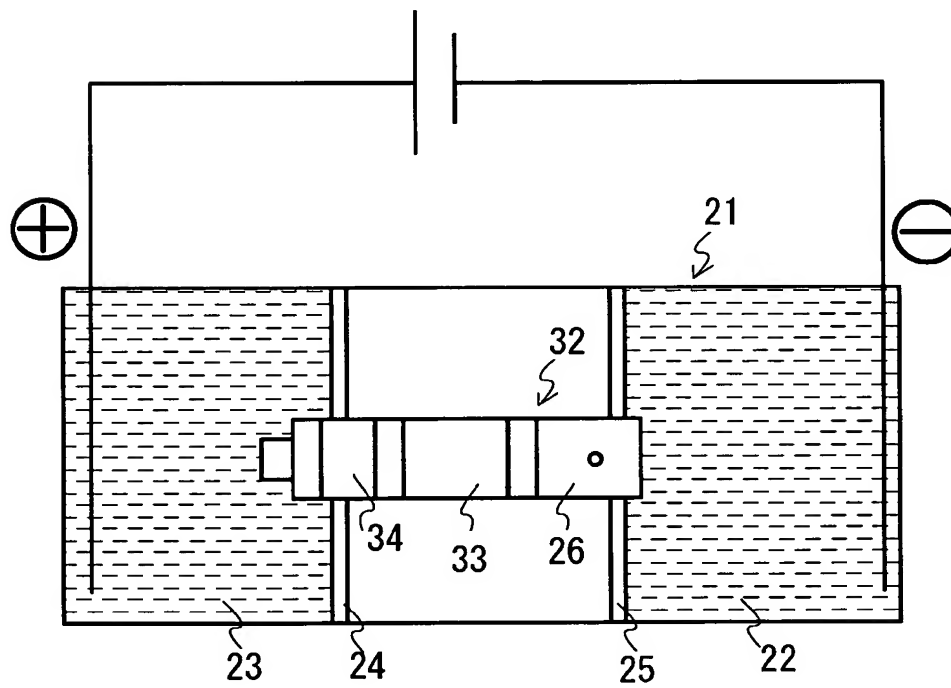
[図3]



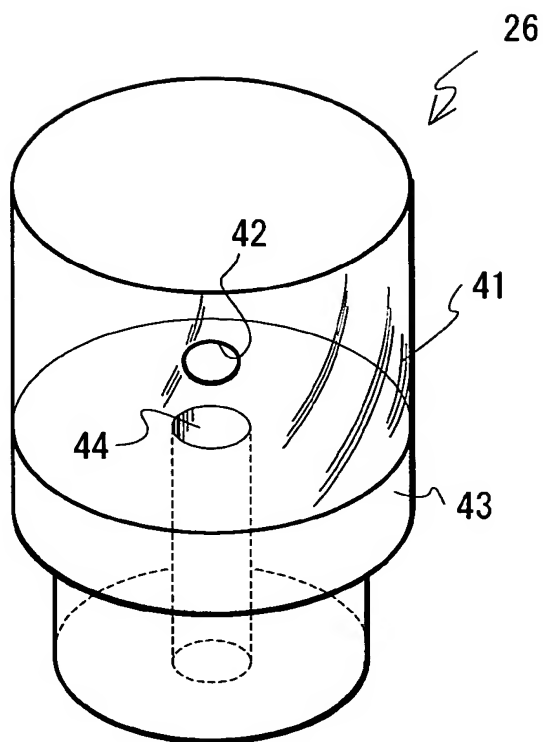
[図4]



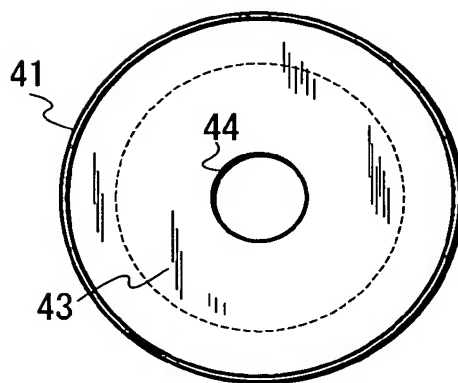
[図5]



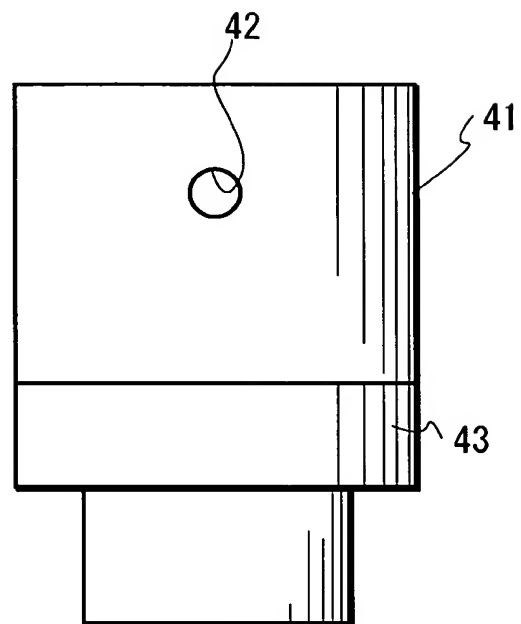
[図6]



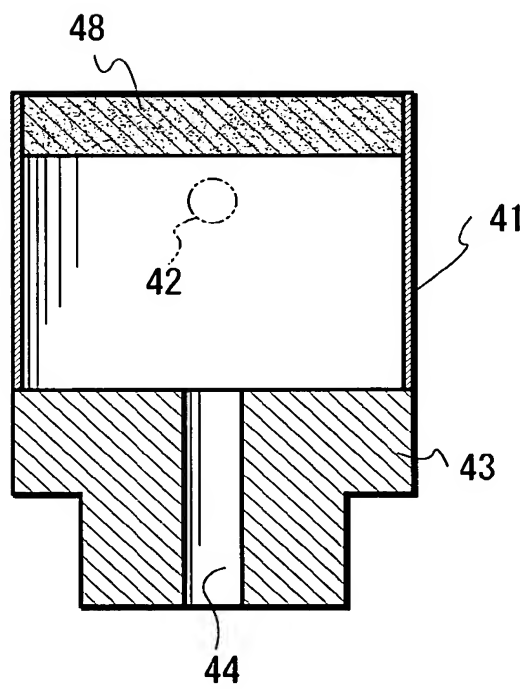
[図7]



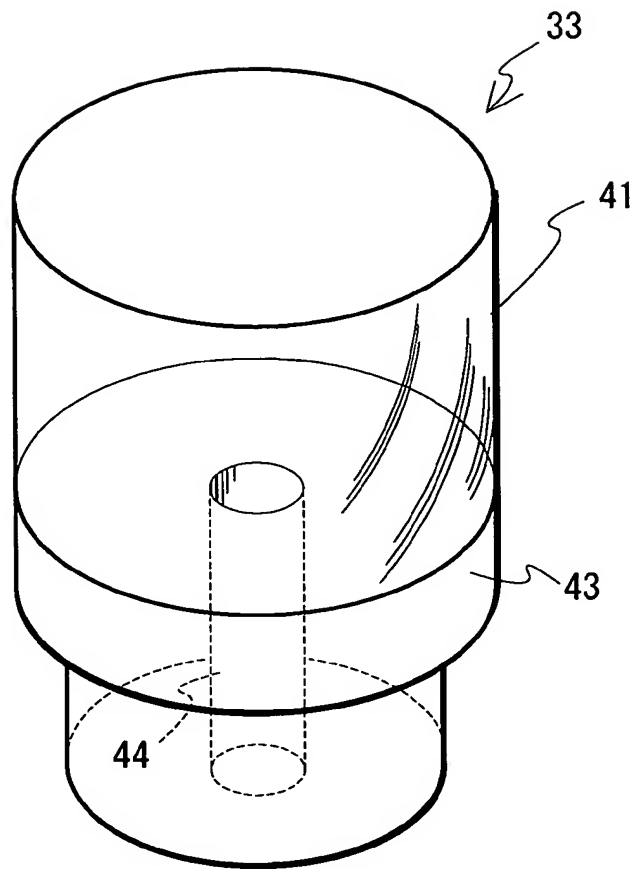
[図8]



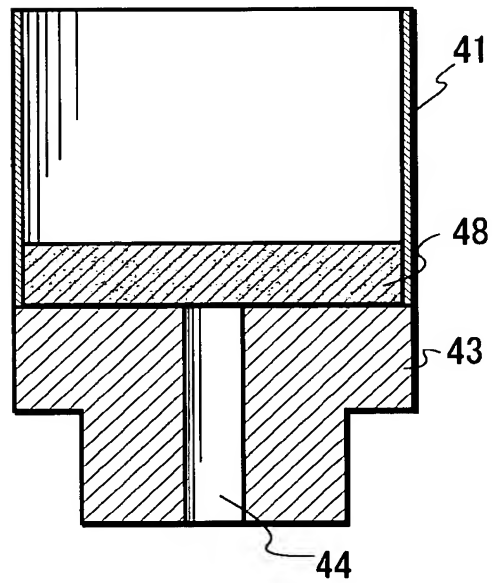
[図9]



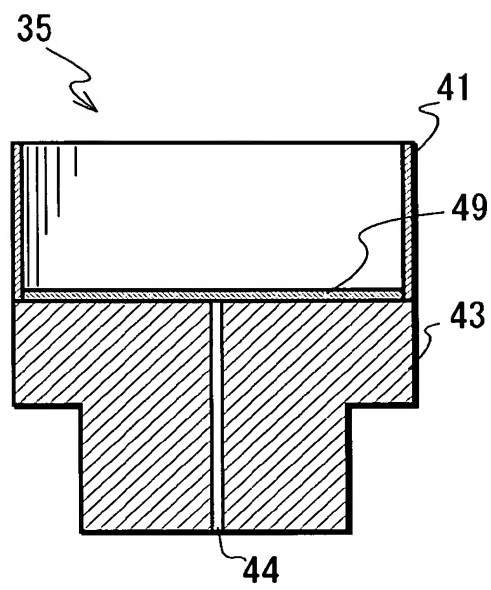
[図10]



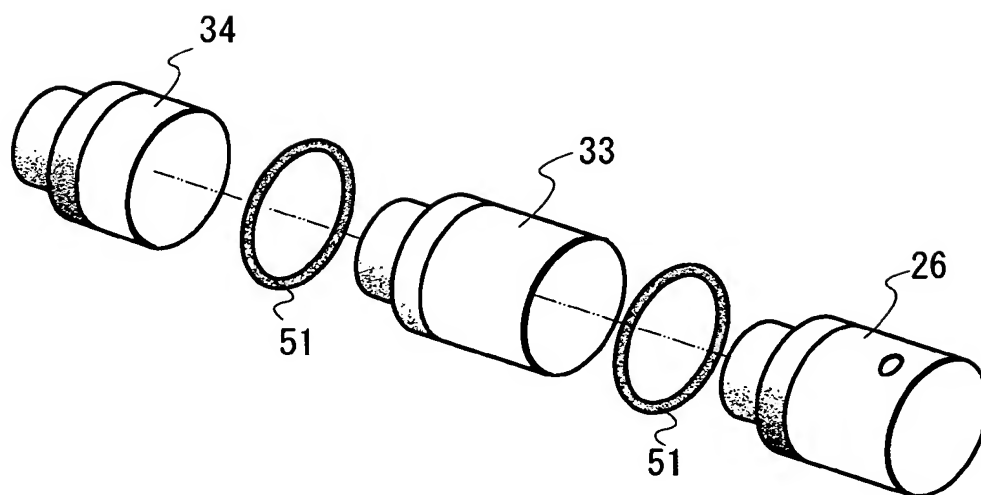
[図11]



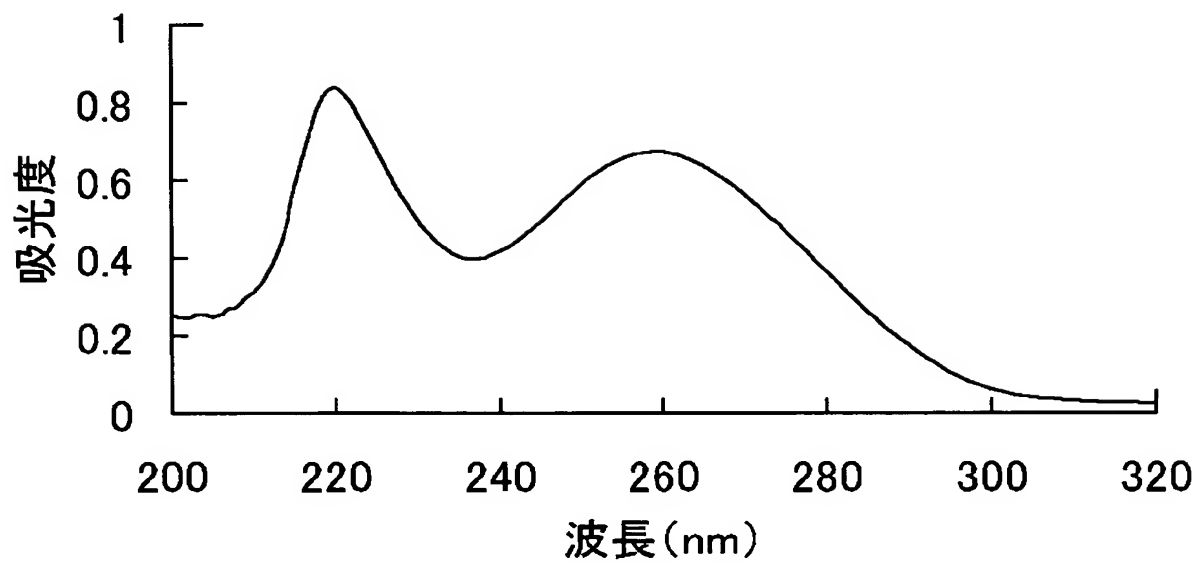
[図12]



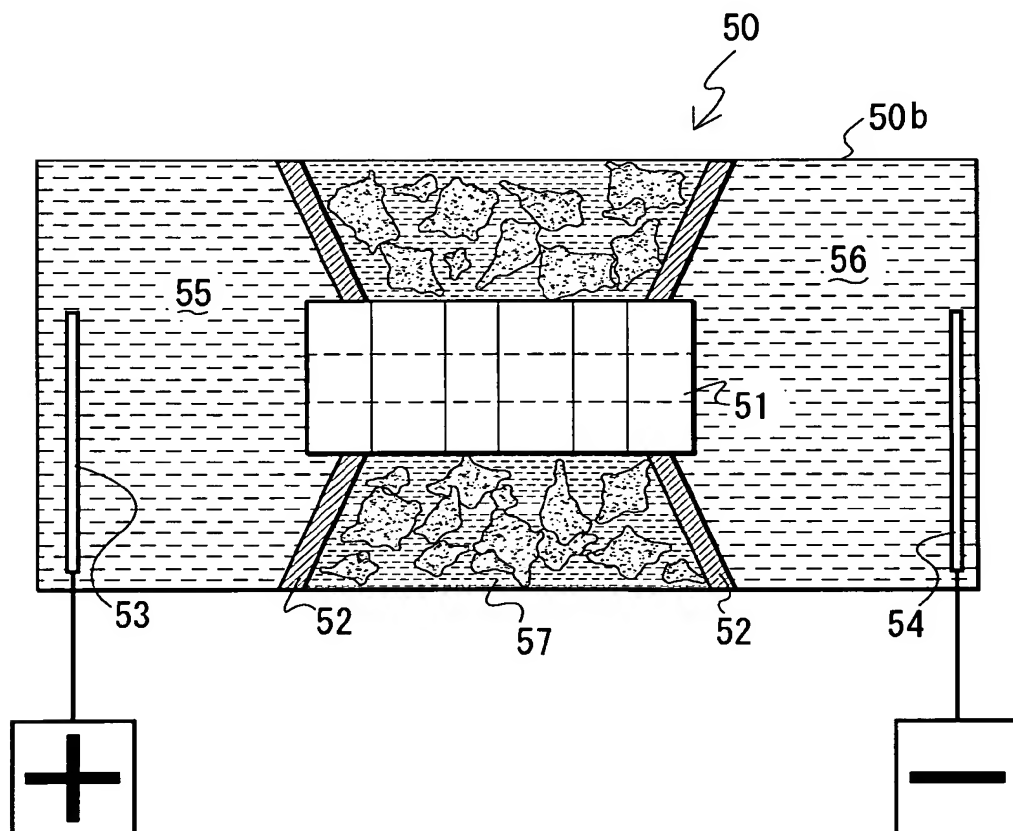
[図13]



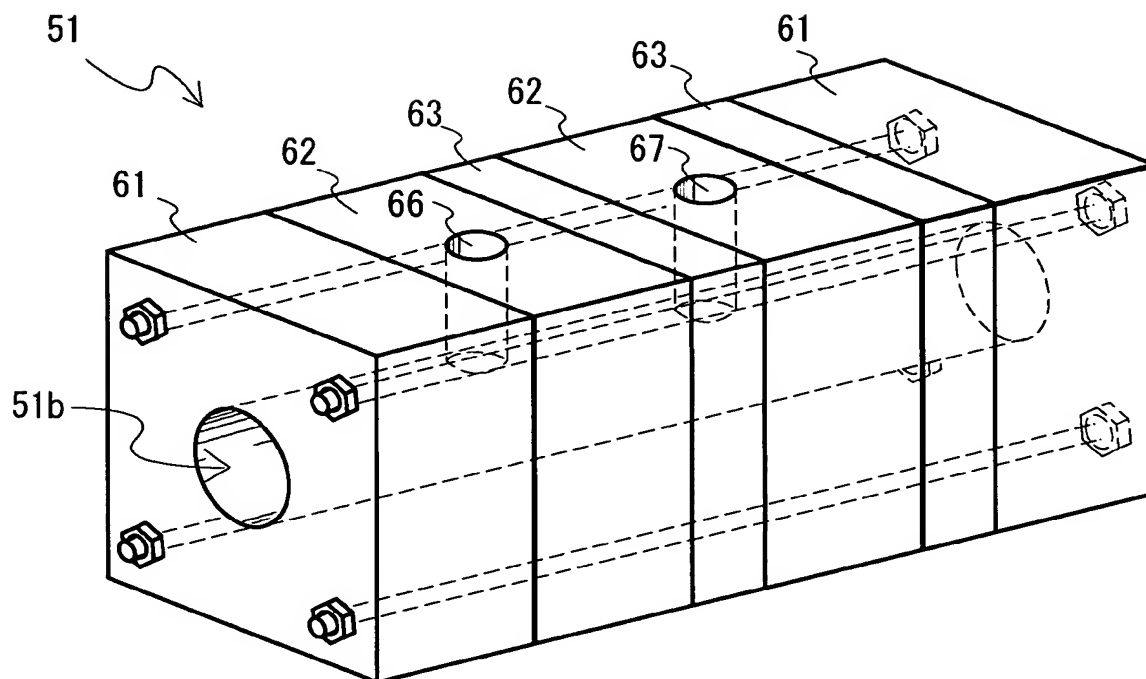
[図14]



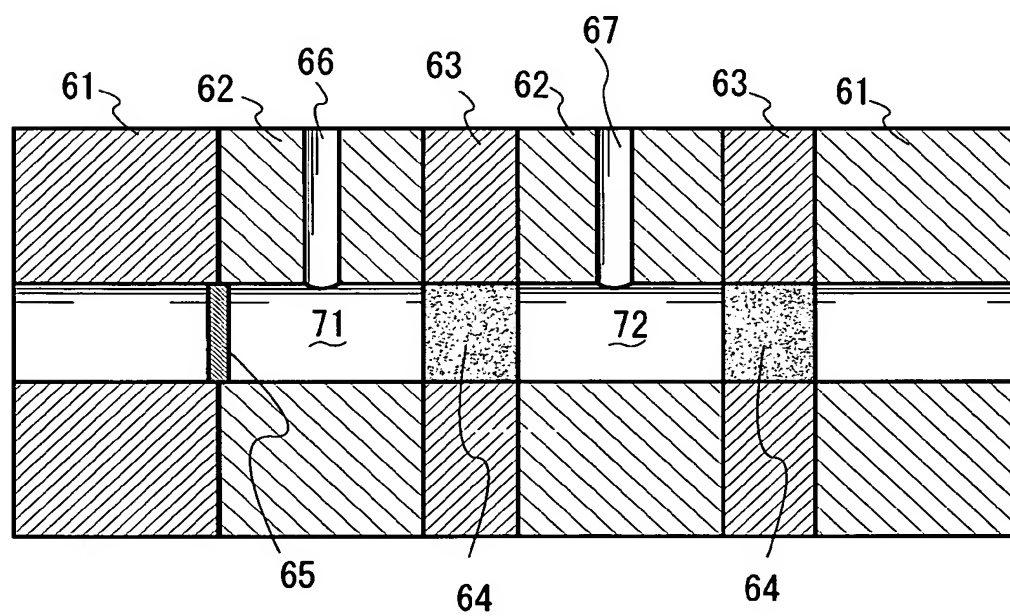
[図15]



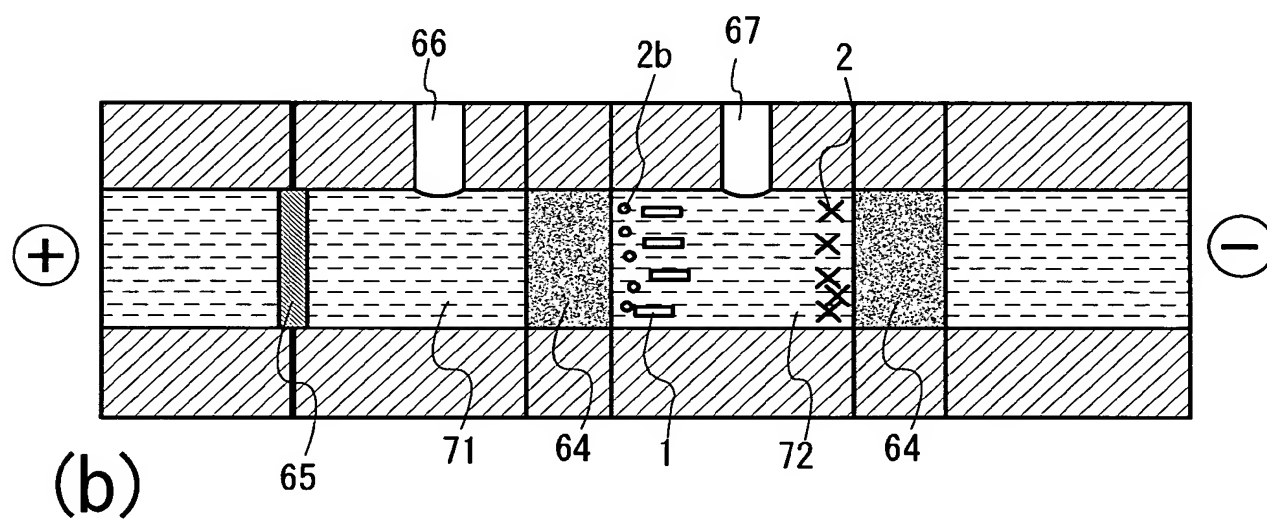
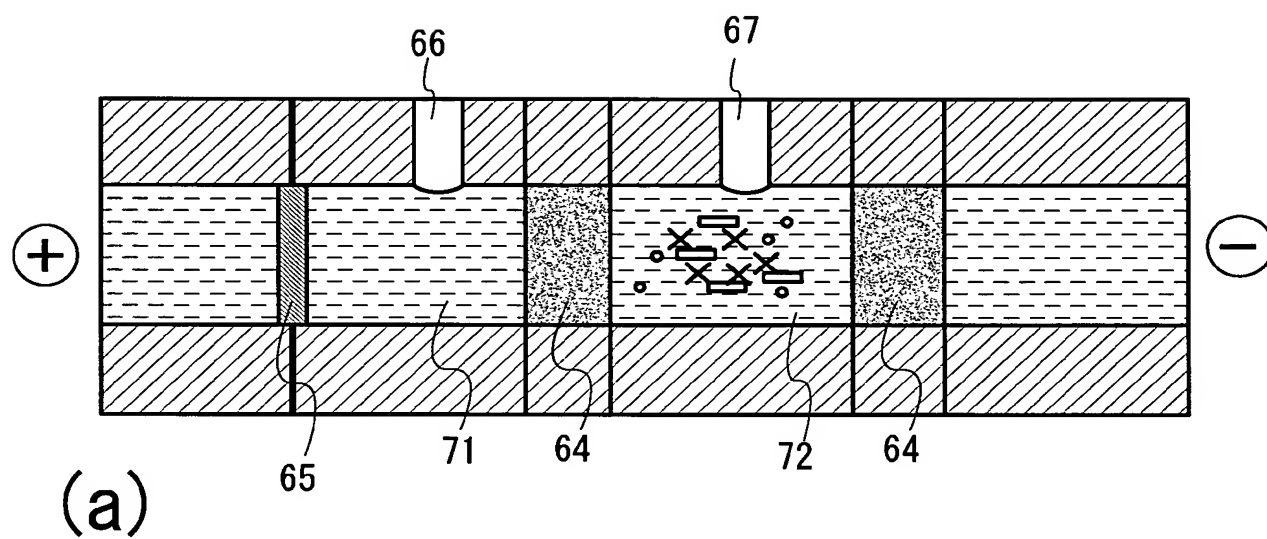
[図16]



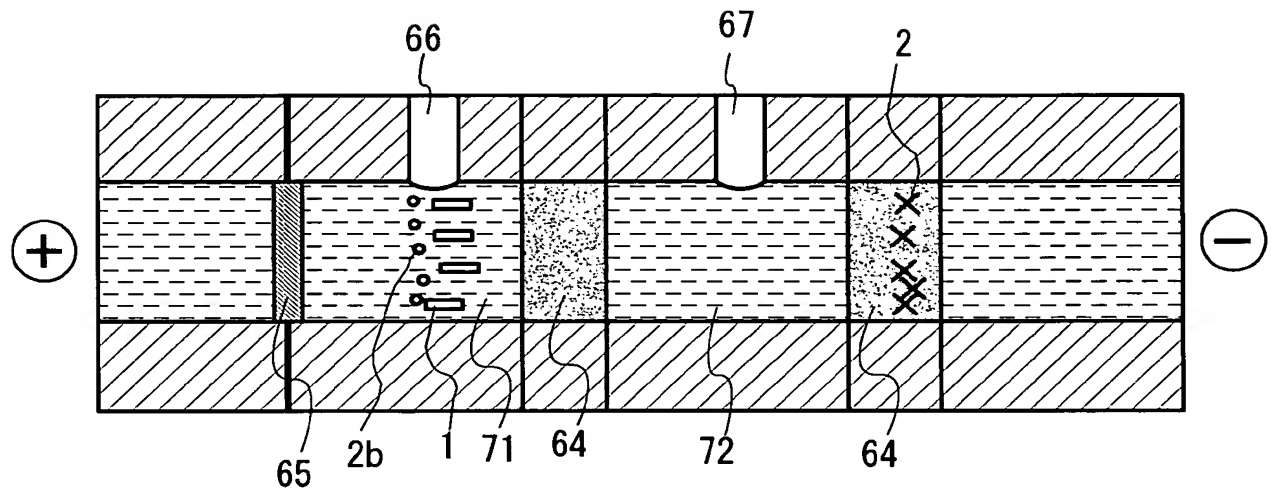
[図17]



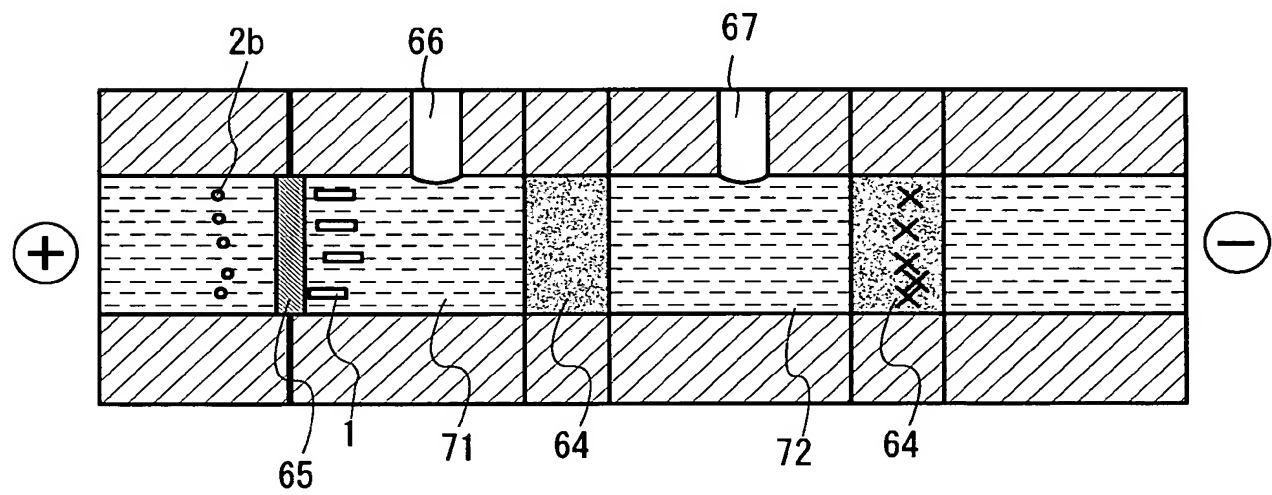
[図18]



[図19]

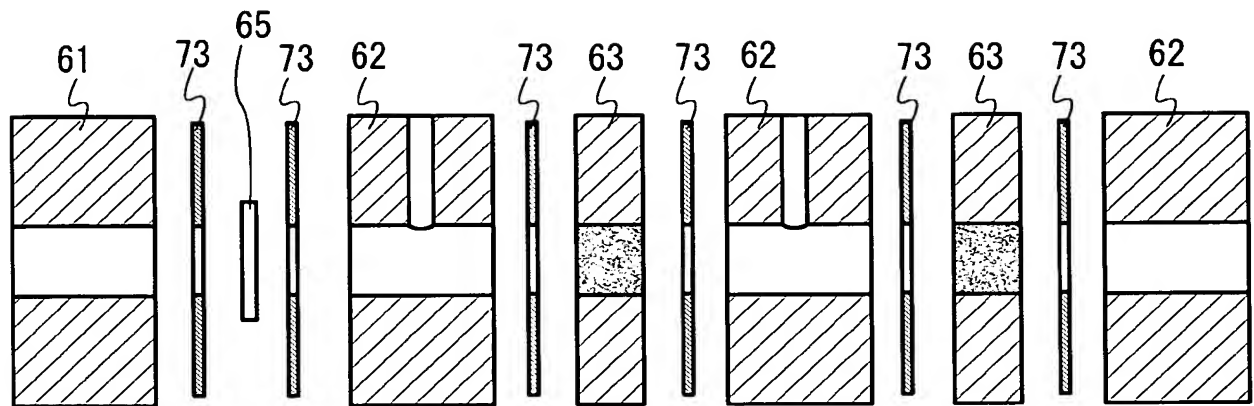


(c)

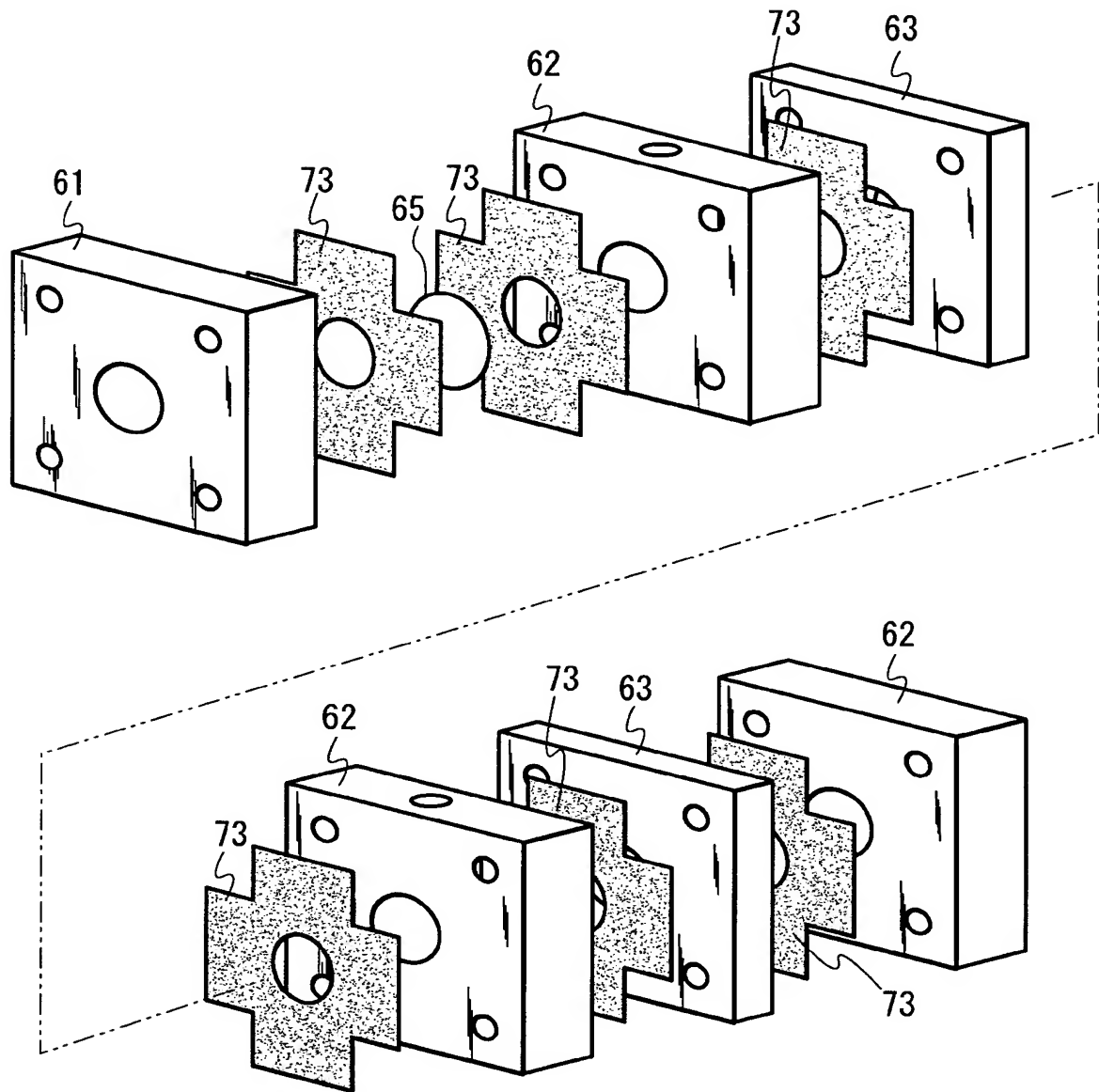


(d)

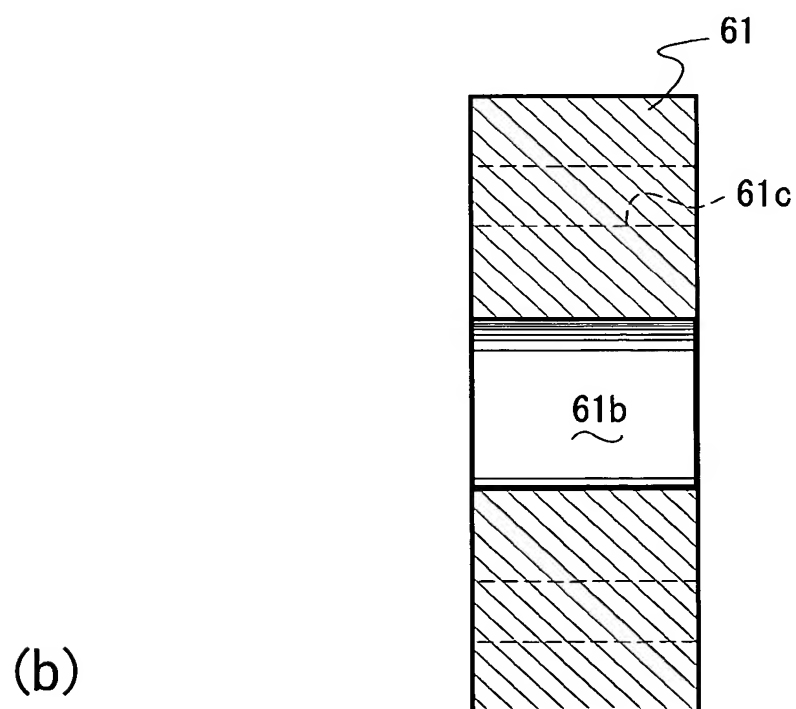
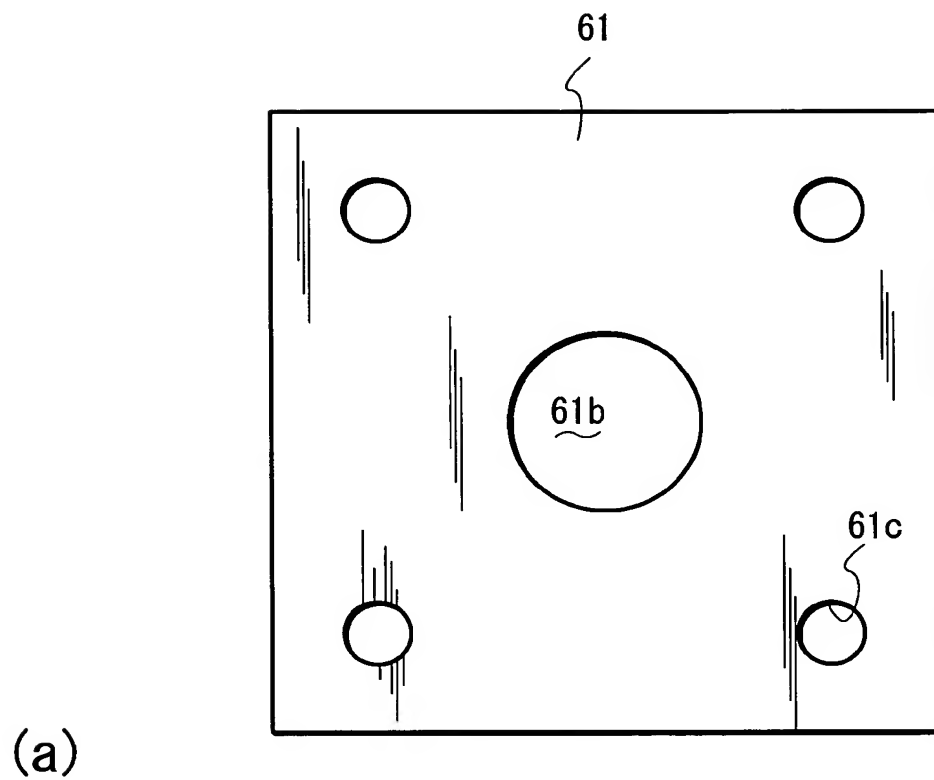
[図20]



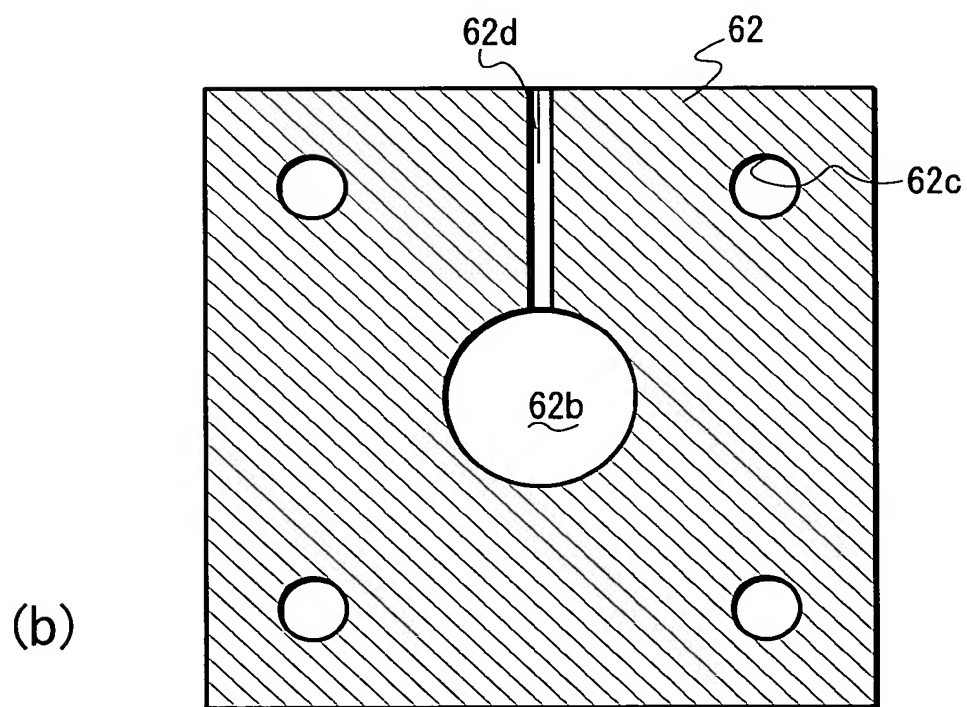
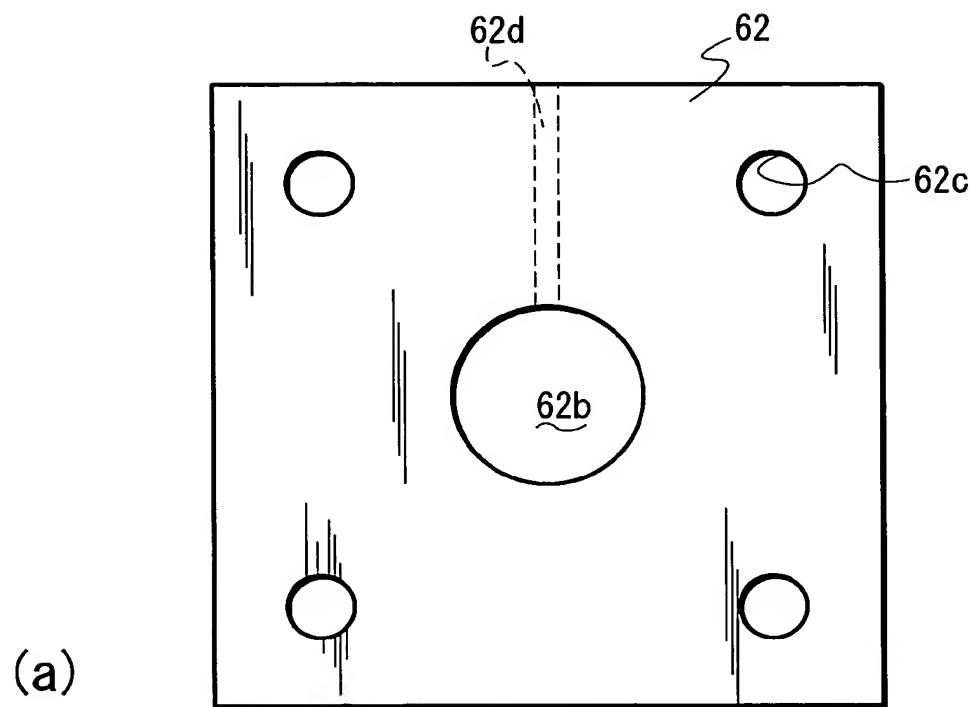
[図21]



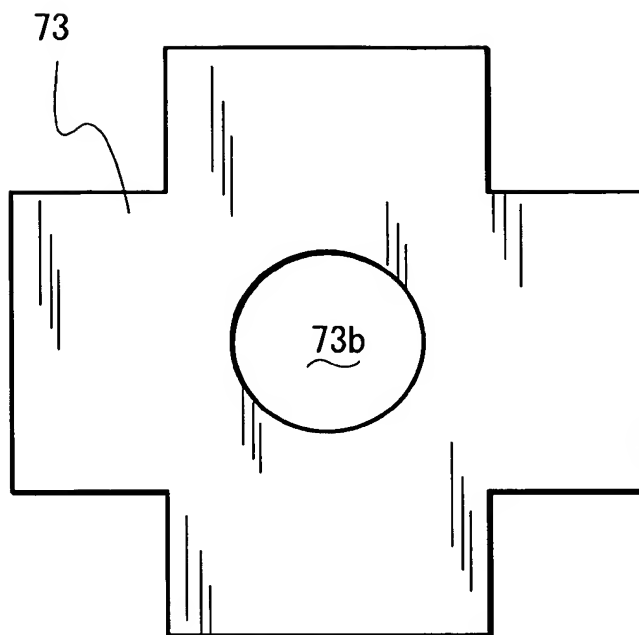
[図22]



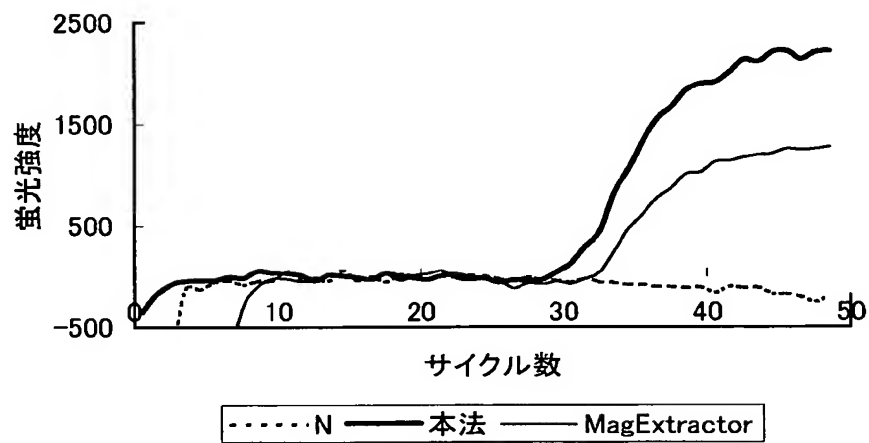
[図23]



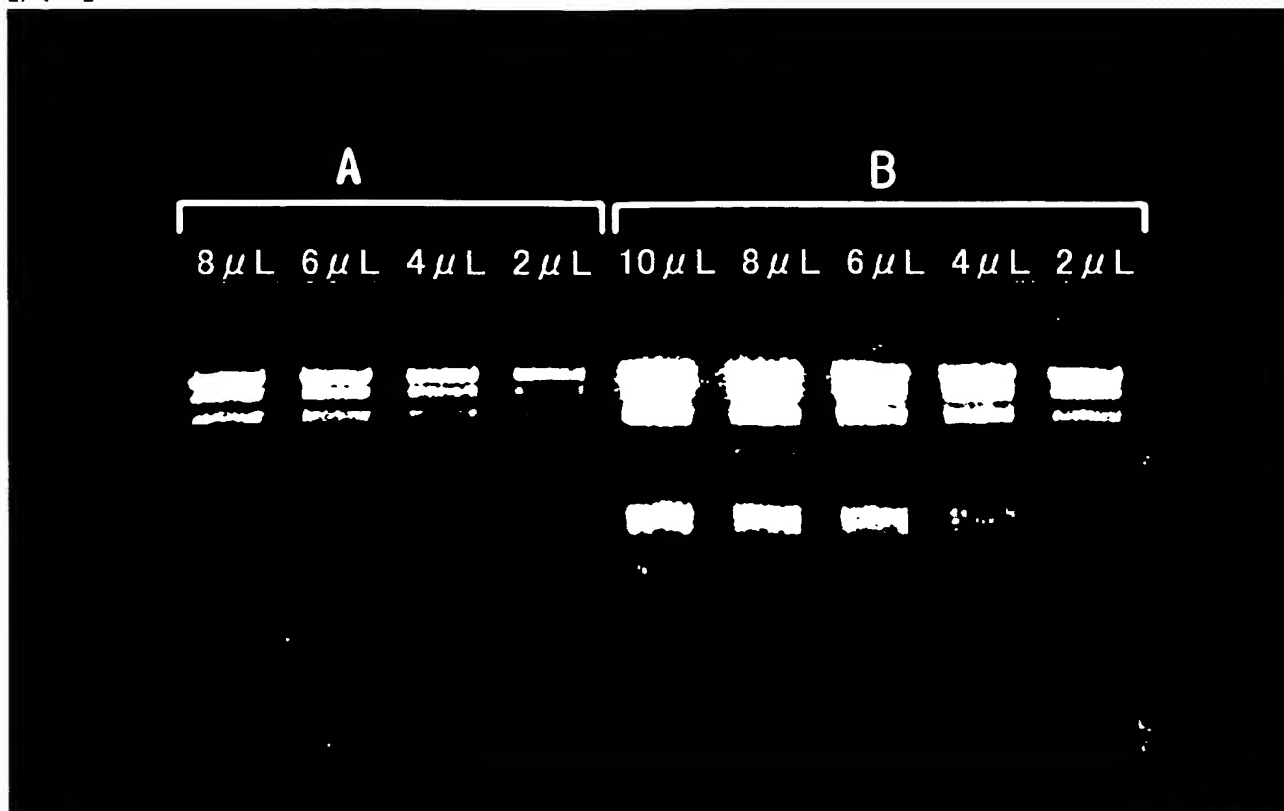
[図24]



[図25]



[図26]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016600

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/00, C12M1/00, C12Q1/68, G01N27/447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00, C12M1/00, C12Q1/68, G01N27/447

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{X}{Y}$	JP 2000-146911 A (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.), 26 May, 2000 (26.05.00), Full text & EP 979868 A2 & CA 2279131 A1 & US 2001/0049437 A1	$\frac{1}{2-5}$
$\frac{X}{Y}$	JP 5-099899 A (Hitachi, Ltd.), 23 April, 1993 (23.04.93), Full text (Family: none)	$\frac{1}{2-5}$
Y	Edited by the Japanese Biochemical Society, Tanpakushitsu I - Bunri Seito Seishitsu -, first edition, Tokyo Kagaku Dojin, 26 February, 1990 (26.02.90), pages 53 to 66	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
01 February, 2005 (01.02.05)

Date of mailing of the international search report
22 February, 2005 (22.02.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016600

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2003-500645 A (BILATEC AG), 07 January, 2003 (07.01.03), Full text & WO 2000/71999 A1 & EP 1180238 A1	6
X	JP 7-203956 A (Canon Inc.), 08 August, 1995 (08.08.95), Full text (Family: none)	6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016600.

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions of claims 1-5 (invention group A) relate to a method of concentrating and purifying a nucleic acid by electrophoresis characterized in that the level of charging is regulated.

The invention of claim 6 is directed to an apparatus for nucleic acid concentration and purification wherein electrophoresis with the constitution recited in the claim is carried out.

The matter common to the invention group A and the invention of claim 6 is an invention relating to a method of concentrating and purifying a nucleic acid by electrophoresis.

(continued to extra sheet)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016600

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

However, this common matter is not special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence, because it was publicly known before the priority date of this application as described in JP 2000-146911 A, etc.

Therefore, this international application does not satisfy the requirement of unity of invention.

It appears that the number of inventions of this international application is 2.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/00, C12M1/00, C12Q1/68, G01N27/447

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/00, C12M1/00, C12Q1/68, G01N27/447

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	JP 2000-146911 A (オルソークリニカル ダイアグノスティクス, インコーポレイティド) 2000.05.26, 全文 & EP 979868 A2 & CA 2279131 A1 & US 2001/0049437 A1	<u>1</u> 2-5
<u>X</u> Y	JP 5-099899 A (株式会社日立製作所) 1993.04.23, 全文 (ファミリーなし)	<u>1</u> 2-5
Y	社団法人 日本生化学会編, タンパク質 I ー分離・精製・性質ー, 第1版, 株式会社 東京化学同人, 1990.02.26, p.53-66	1-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.02.2005

国際調査報告の発送日

22.2.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高畑 栄二

4 B

3 2 2 7

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2003-500645 A (ビラテック アクチェンゲゼルシャフト) 2003.01.07, 全文 & WO 2000/71999 A1 & EP 1180238 A1	6
X	JP 7-203956 A (キヤノン株式会社) 1995.08.08, 全文 (ファミリーなし)	6

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

・請求の範囲1-5に係る発明(発明群A)は、荷電量の調節を行うことを特徴とする電気泳動を用いた核酸の濃縮精製方法に関する発明である。

・請求の範囲6に係る発明は、同項に記載された構成を有する電気泳動を行う核酸の濃縮精製装置である。

発明群Aと請求の範囲6に係る発明に共通の事項は、電気泳動を用いた核酸の濃縮精製方法に関する発明であることである。

しかしながら、JP 2000-146911 Aなどに記載されているように、当該事項は本願優先日前に公知であったので、PCT規則13.2の第2文の意味において、この共通事項は特別な技術的特徴ではない。

よって、本国際出願は発明の単一性の要件を満たしていない。

なお、本国際出願の発明の数は2であると認められる。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。